



TITLE:

Cell Density-dependent Increase in Tyrosine-monophosphorylated ERK2 in MDCK Cells Expressing Active Ras or Raf(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kawabata, Noriyuki

CITATION:

Kawabata, Noriyuki. Cell Density-dependent Increase in Tyrosine-monophosphorylated ERK2 in MDCK Cells Expressing Active Ras or Raf. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20243>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	河 緒 憲 幸
論文題目	Cell Density-dependent Increase in Tyrosine-monophosphorylated ERK2 in MDCK Cells Expressing Active Ras or Raf (Ras 及びRaf 変異発現イヌ腎上皮細胞における、細胞密度依存性の活性型 ERK2 から非活性型 ERK2 への遷移)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】 Ras 及び Raf は細胞増殖シグナル伝達系の主要因子であり、その持続活性化型変異はヒトがん発症の主たる原因である。この知見に一致して Ras 及び Raf の下流シグナルである Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) の活性型であるリン酸化 ERK (pERK) は様々ながん組織で増加が確認される一方、Ras や Raf 変異の存在にも関わらず pERK の増加を認めない場合もしばしばある。これは ERK 上流の Ras や Raf からのシグナルへ細胞が応答した、或いは pERK 検知法の技術的限界などが示唆されている。また、がん化細胞の特性の一つに接触障害の喪失があるが、Ras や Raf 変異細胞における接触障害が ERK にどう作用するか今まで報告されていない。更に、殆どの in vitro 実験系では接触障害を回避するため敢えて細胞を疎に配置した状態で観察しているという問題もある。そこで、本研究では Ras および Raf 変異のある細胞における接触障害の ERK 活性に及ぼす影響について研究した。</p> <p>【方法】 上皮系細胞である Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞に ERK 活性の可視化を可能とする FRET (Förster resonance energy transfer) バイオセンサーを導入し、更に持続活性化型変異である RasG12V 又は BRafV600E を Cre 依存性に誘導する細胞株を樹立した。この細胞を変異発現の有無に分け、更に細胞密度を変えて ERK 活性を観察した。</p> <p>【結果】 細胞密度に注目した検討では RasG12V、又は BrafV600E 変異誘導の有無に関わらず、高細胞密度になると低細胞密度より ERK 活性は抑制された。一方、変異の有無では、低細胞密度では変異誘導前に比べて誘導後の MDCK 細胞の ERK 活性は高くなったが、細胞が密集した状態では変異導入前と比肩できる程度まで ERK 活性は抑えられた。高細胞密度下では無機物であるシリコン製の仕切りに面した細胞も同様に ERK 活性は抑制され、この仕切りの除去による ERK 活性の上昇、更に再密集により ERK 活性は徐々に低下したことから、この ERK 活性の抑制には細胞間接着そのものが必須ではないことが示された。</p> <p>ERK 活性は ERK のスレオニン (T) 及びチロシン (Y) 残基のリン酸化によりコントロールされており、段階的にリン酸化を受け、両残基がリン酸化された pTpY-ERK が酵素活性を持つことが知られている。Phos-tag SDS PAGE により、高細胞密度の細胞では低細胞密度に比べて pTpY-ERK2 が低下し、同時に pY-ERK2 の上昇を認めた。この遷移は変異型でより顕著であり、pTpY-ERK 活性を観測している FRET バイオセンサーによる結果に矛盾しなかった。</p> <p>高細胞密度によるスレオニン残基の脱リン酸化にセリン/スレオニンフォスファターゼの阻害薬 Calyculin A 及び Okadaic acid を添加したところ、その特異性によりセリン/スレオニンフォスファターゼの中で PP1 の関与が示唆された。</p> <p>【結論】 本研究から、がん化細胞の特徴である接触障害の喪失は Ras や Raf 変異のみでは充分でなく、変異細胞であっても密集した状態では ERK は抑制されること、この抑制には生細胞同士の接触が必須でないこと、細胞密度依存性のシグナル抑制にセリン/スレオニンフォスファターゼ、中でも PP1 が関与していることが示唆され、これが報告されているがん組織における細胞増殖シグナル pERK 発現乖離の理由</p>			

の一つと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

Ras 及び **Raf** は細胞増殖シグナル伝達系の主要因子であり、その持続活性化型変異はヒトがん発症の主たる原因とされる。しかし、**Ras** や **Raf** 変異の存在にも関わらず活性化 **ERK** の増加を認めない場合もしばしばある。また、がん化細胞の特性の一つに接触阻害の喪失があるが、**Ras** や **Raf** 変異細胞における接触阻害が **ERK** にどう作用するか今まで報告されていない。そこで、今までの **ERK** を観察する実験系には細胞密度に大きな違いがあることに注目し、**Ras** および **Raf** 変異のある細胞において、細胞密度が **ERK** 活性に及ぼす影響について **ERK** 活性をモニターする **FRET** バイオセンサーを用いて研究した。

イヌ腎上皮細胞において、細胞密度が低い状態では **Ras**、**Raf** 変異遺伝子の発現により **ERK** 活性は高くなったが、細胞が密集した状態では **ERK** 活性は変異遺伝子の発現がされていない状態と同程度まで抑制された。また、この **ERK** の抑制はセリンスレオニンフォスファターゼの関与が示され、特に **PP1** の寄与が示唆された。

以上の結果は、**Ras** 及び **Raf** 変異細胞における **ERK** の活性化に関して異なった報告がなされている原因として、細胞密度の違いが関与している可能性を示すと共に、上皮におけるがん化抑制のメカニズムとして細胞密度依存性のセリンスレオニンフォスファターゼ活性の上昇も関与することを示唆する。

したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降